

氏 名	う え の ま こ と 上 野 誠
学 位 の 種 類	博士（農学）
学 位 記 番 号	甲第369号
学位授与年月日	平成17年 3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学 位 論 文 題 目	擬似病斑形成変異イネを利用したいもち病抵抗性の発現解析 に関する研究 (Studies on the expression of blast resistance in lesion mimic mutant of rice infected with <i>Magnaporthe grisea</i>)
学位論文審査委員	(主査) 荒 瀬 栄 (副査) 尾 谷 浩 田 中 秀 平 柴 田 均 木 原 淳 一

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究は、擬似病斑形成変異イネ関口朝日の光依存的抵抗性の発現機構を生理学的あるいは分子生物学的に究明したものである。得られた結果は以下のように要約される。

- (1)変異イネ（品種：関口朝日）にイネいもち病菌の感染を阻害する抗菌性物質の存在することを発見し、これをインドール系化合物の一つであるトリプタミン（分子量 160.1）と同定した。トリプタミンは、0.15-0.3 mg/ml の低濃度ではイネいもち病菌胞子の発芽は阻害しなかったが、付着器からの侵入菌糸形成は著しく阻害した。0.6 mg/ml 以上の高濃度になると胞子発芽を阻害した。トリプタミンは、イネいもち病菌を接種した関口朝日では光依存的に形成された関口病斑には著しく蓄積したが、いもち病斑には蓄積しなかった。これらの結果はトリプタミンが関口朝日での光依存的な抵抗性発現に重要な役割を持っていることを示唆した。
- (2)イネいもち病菌を接種した関口朝日ではトリプトファン脱炭酸酵素（TDC）及びモノアミン酸化酵素(MAO)の活性が光依存的に増加した。しかも TDC 及び MAO 活性の増加は、イネいもち病菌のイネ体侵入前から見られ、関口病斑形成時に最大となり、その後もこの高活性は維持された。クローニングした TDC 遺伝子の発現を見ると、同じく光依存的に増加した。イネいもち病菌の胞子発芽液もこれら酵素活性の増加とトリプタミン蓄積を誘導すると共に、関口病斑形成を誘導した。関口病斑は、MAO の基質となるトリプタミンや β -フェニルエチルアミン処理によっても光依存的に誘導されたが、基質とならないインドール-3-プロピニオン酸、トリプトファン及び(±)-フェニルエチルアミンでは誘導されなかった。トリプタミンに

よる関口病斑形成は、MAO の阻害剤（セミカーバザイド及びメトラキシル）や過酸化水素（ H_2O_2 ）消去剤（アスコルビン酸及びカタラーゼ）の存在下では顕著に阻害された。このことは関口病斑形成に H_2O_2 が関与していることを示した。事実、光照射下の接種 24 時間後のイネいもち病菌付着器直下のイネ細胞では 3,3'-Diaminobenzidine(DAB)試薬により H_2O_2 生成を示す陽性反応が観察された。一方、 H_2O_2 も関口病斑形成を光照射下では誘導したが、暗黒では誘導しなかった。この違いには光条件下では抑制され、暗黒では抑制されなかったカタラーゼ活性が関係していた。

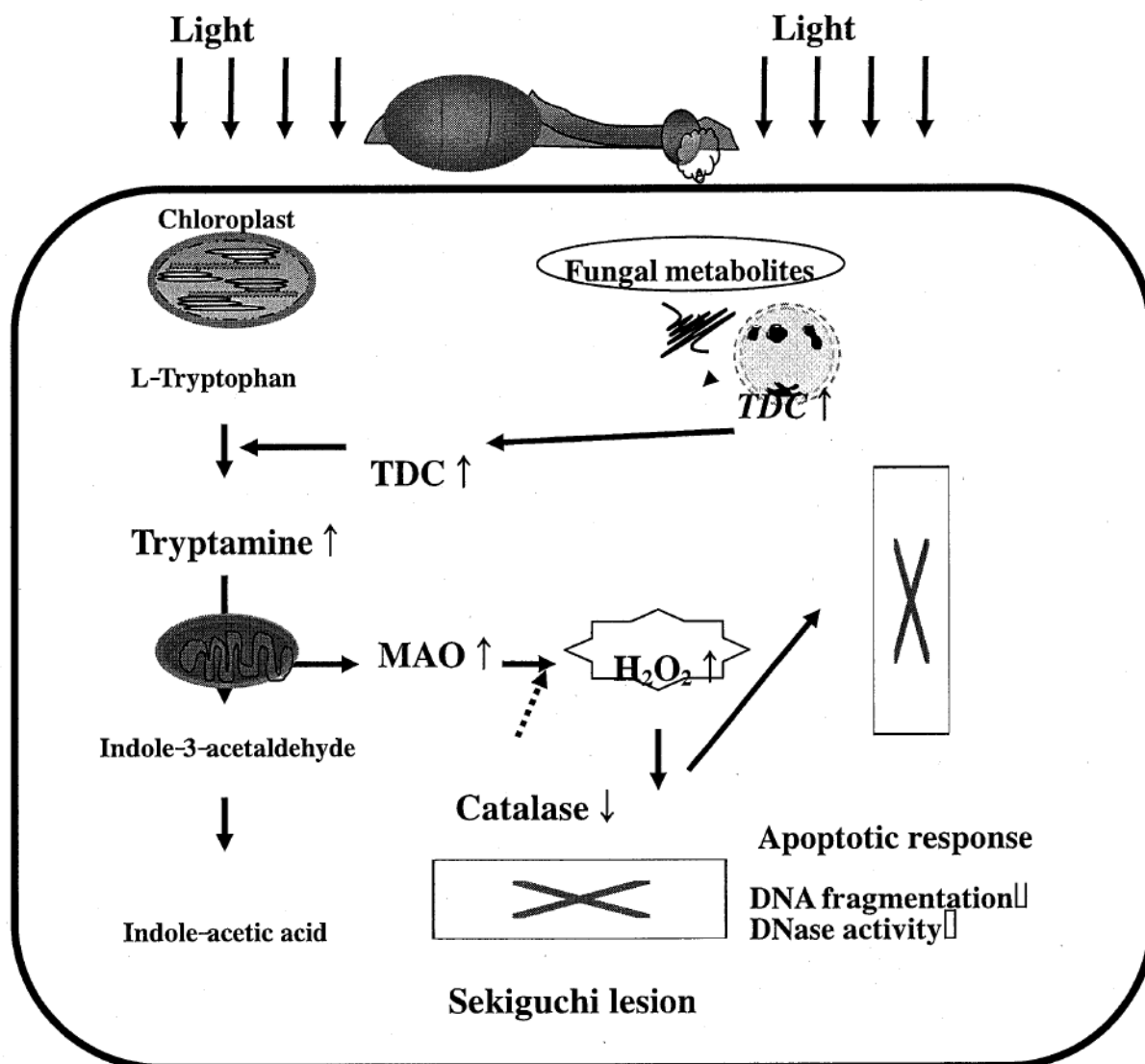
(3)イネいもち病菌を接種した関口朝日を光照射下に保つと DNA の断片化や DNase 活性の増加が観察されたが、タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシシド又は熱処理により関口病斑形成、トリプタミン蓄積あるいはトリプタミン関連酵素（TDC 及び MAO）活性を著しく抑制したイネ葉ではそれらも観察されなくなった。このような違いは、細胞死の検出試薬であるエバンスブルーを用いても認められた。即ち、関口病斑では細胞死の誘導を示す強いエバンスブルー染色が観察されたがいもち病斑では認められなかった。

(4) 関口系変異イネ関口朝日以外の関口コシヒカリ及び関口ササニシキにおける、トリプタミン経路の活性化とアポトーシス誘導も光依存的であった。また、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-nic end labeling (TUNEL)法や電気泳動法により核の DNA 崩壊や DNase 活性の増加も光依存的に起こっていた。しかし、シクロヘキシシド又は熱処理によりトリプタミン経路を抑制すると、DNA の崩壊や断片化あるいは DNase 活性も抑制された。

(5)イネいもち病菌を接種した関口朝日を長波長域（550-650nm）の光条件下に保つと著しいトリプタミン経路の活性化が観察されたが、短波長域（200-500nm）の光条件下では観察されなかった。さらに、長波長域の光条件下の接種葉では著しいカタラーゼ活性の低下とそれに伴う H_2O_2 の生成・蓄積が観察された。しかし、短波長域の光条件下では高いカタラーゼ活性が維持されており、 H_2O_2 の生成・蓄積は見られなかった。

(6)イネいもち病菌に対して抗菌性を示さない濃度のインドール酢酸、トリプタミン及びトリプトファンをオオムギに処理しておくといネいもち病菌による病斑形成や侵入菌糸形成が著しく抑制された。しかも化合物前処理葉ではキチナーゼ、パーオキシダーゼ及びフェニルアラニンアンモニアリアーゼなどの抵抗性関連酵素の活性も増加した。さらに過酸化水素生成も観察された。これらの結果はインドール酢酸、トリプタミン及びトリプトファンなどのインドール化合物が plant activator としてイネいもち病菌の防除に利用できる可能性を示した。

以上の結果より、1)関口系変異イネにはトリプタミン経路が存在し、その活性化には長波長域の可視光が必要である。2)トリプタミン経路の活性化により合成されたトリプタミンは、MAO により酸化され H_2O_2 が生成されるが、可視光下ではカタラーゼによる消去が行われないためにその蓄積が起こる。3) 蓄積した H_2O_2 はイネ細胞にアポトーシス反応を伴った細胞死を誘導するが、この細胞死は半活物寄生菌であるイネいもち病菌とイネ細胞の初期共生関係の成立を阻害するためにイネいもち病菌感染は不成立に終わると考えられた。



論文審査の結果の要旨

本研究は、擬似病斑形成変異イネ関口朝日の光依存的抵抗性の発現機構を生理学的あるいは分子生物学的に究明したものである。得られた結果は以下のように要約される。

(1)変異イネ（品種：関口朝日）にイネいもち病菌の感染を阻害する抗菌性物質の存在することを発見し、これをインドール系化合物の一つであるトリプタミン（分子量 160.1）と同定した。トリプタミンは、0.15-0.3 mg/ml の低濃度ではイネいもち病菌胞子の発芽は阻害しなかったが、付着器からの侵入菌糸形成は著しく阻害した。0.6 mg/ml 以上の高濃度になると胞子発芽を阻害した。トリプタミンは、イネいもち病菌を接種した関口朝日では光依存的に形成された関口病斑には著しく蓄積したが、いもち病斑には蓄積しなかった。これらの結果はトリプタミンが関口朝日での

光依存的な抵抗性発現に重要な役割を持っていることを示唆した。

(2) イネいもち病菌を接種した関口朝日ではトリプトファン脱炭酸酵素 (TDC) 及びモノアミン酸化酵素(MAO)の活性が光依存的に増加した。しかも TDC 及び MAO 活性の増加は、イネいもち病菌のイネ体侵入前から見られ、関口病斑形成時に最大となり、その後もこの高活性は維持された。クローニングした TDC 遺伝子の発現を見ると、同じく光依存的に増加した。イネいもち病菌の孢子発芽液もこれら酵素活性の増加とトリプタミン蓄積を誘導すると共に、関口病斑形成を誘導した。関口病斑は、MAO の基質となるトリプタミンや β -フェニルエチルアミン処理によっても光依存的に誘導されたが、基質とならないインドール-3-プロピニオン酸、トリプトファン及び(±)-フェニルエチルアミンでは誘導されなかった。トリプタミンによる関口病斑形成は、MAO の阻害剤や過酸化水素消去剤の存在下では顕著に抑制された。このことは、関口病斑形成に H_2O_2 が関与していることを示した。事実、光照射下の接種 24 時間後のイネいもち病菌付着器直下のイネ細胞では 3,3'-Diaminobenzidine(DAB)試薬により H_2O_2 生成を示す陽性反応が観察された。一方、 H_2O_2 も関口病斑形成を光照射下では誘導したが、暗黒では誘導しなかった。この違いには光条件下では抑制され、暗黒では抑制されなかったカタラーゼ活性が関係していた。

(3) イネいもち病菌を接種した関口朝日を光照射下に保つと DNA の断片化や DNase 活性の増加が観察されたが、タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミド又は熱処理により関口病斑形成、トリプタミン蓄積あるいはトリプタミン関連酵素 (TDC 及び MAO) 活性を著しく抑制したイネ葉ではそれらも観察されなくなった。このような違いは、細胞死の検出試薬であるエバンスブルーを用いても認められた。即ち、関口病斑では細胞死の誘導を示す強いエバンスブルー染色が観察されたがいもち病斑では認められなかった。

(4) 関口系変異イネ関口朝日以外の関口コシヒカリ及び関口ササニシキにおける、トリプタミン経路の活性化とアポトーシス誘導も光依存的であった。また、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-nic end labeling (TUNEL)法や電気泳動法により核の DNA 崩壊や DNase 活性の増加も光依存的に起こっていた。しかし、シクロヘキシミド又は熱処理によりトリプタミン経路を抑制すると、DNA の崩壊や断片化あるいは DNase 活性も抑制された。

(5) イネいもち病菌を接種した関口朝日を長波長域 (550-650nm) の光条件下に保つと著しいトリプタミン経路の活性化が観察されたが、短波長域 (200-500nm) の光条件下では観察されなかった。さらに、長波長域の光条件下の接種葉では著しいカタラーゼ活性の低下とそれに伴う H_2O_2 の生成・蓄積が観察された。しかし、短波長域の光条件下では高いカタラーゼ活性が維持されており、 H_2O_2 の生成・蓄積は見られなかった。

以上の結果より、1)関口系変異イネにはトリプタミン経路が存在し、その活性化には長波長域の可視光が必要である。2)トリプタミン経路の活性化により合成されたトリプタミンは、MAO により酸化され H_2O_2 が生成されるが、可視光下ではカタラーゼによる消去が行われないためにその蓄積が起こる。3) 蓄積した H_2O_2 はイネ細胞にアポトーシス反応を伴った細胞死を誘導するが、この細胞死は半活物寄生菌であるイネいもち病菌とイネ細胞の初期共生関係の成立を阻害するためにイネいもち病菌感染は不成立に終わると考えられた

擬似病斑形成変異イネの利用により明らかにされた「光誘導抵抗性」に関する上記の研究業績は、植物の病害抵抗性機構の解明という植物病理学の重要課題の解明に寄与する新発見であり、博士（農学）の学位を与えるに十分な価値を持つものと判定した。